

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2424—2010

进出口食品中副溶血性弧菌快速 及鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法

Rapid detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in foods for import and export—
Real-time quantitative PCR method

2010-01-10 发布

2010-07-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 均为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中山大学达安基因股份有限公司。

本标准主要起草人：翁文川、刘超、许龙岩、易敏英、胡科锋、焦红、王方金、程钢。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中副溶血性弧菌快速 及鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中副溶血性弧菌的实时荧光 PCR 快速检验方法。
本标准适用于进出口食品中副溶血性弧菌的快速检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验 总则
GB/T 4789.7 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验
SN/T 0173 出口食品副溶血性弧菌检验方法
SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

实时荧光定量 PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.2

Ct 值

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.3

DNA deoxyribonucleic acid

简称脱氧核糖核酸。

3.4

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

3.5

dATP deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

3.6

dCTP deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

3.7

dGTP deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.8

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

3.9

dUTP deoxyuridine triphosphate

脱氧尿苷三磷酸。

3.10

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链式反应,简称 PCR。

3.11

Tris tris-hydroxymethyl aminomethane

三羟甲基氨基甲烷。

3.12

UNG uracil N-glycosylase

尿嘧啶 *N*-糖基化酶。

3.13

Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

3.14

PBS

磷酸盐缓冲生理盐水。

4 测试方法

4.1 方法原理

采用 *TaqMan* 方法,在比对副溶血性弧菌 *gyrase* 基因的基础上,设计针对该基因的特异性引物和特异性的荧光双标记探针进行配对。探针 5'端标记了 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示),3'端标记了 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示),它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。PCR 反应进入退火阶段时,引物和探针同时与目的基因片段结合,此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收,仪器检测不到荧光信号;而反应进行到延伸阶段时,*Taq* DNA 聚合酶发挥其 5'→3'外切核酸酶功能,将探针降解。这样探针上的 R 基团游离出来,所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测所接收。随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

4.2 培养基和试剂

4.2.1 30 g/L 氯化钠稀释液(见附录 A)。

4.2.2 60 g/L 氯化钠蛋白胨液(见附录 A)。

4.2.3 单料氯化钠多粘菌素 B 肉汤(见附录 A)。

4.2.4 灭菌双蒸水。

4.2.5 离心管:2 mL、1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL。

4.2.6 吸管:1 mL、10 mL,分刻度 0.1 mL。

4.2.7 成套试剂盒配置

4.2.7.1 试剂盒引物:

上游:5'-CGGTA GTAAA CCCAC TGTCA G-3'

下游:5'-GTTTC AGGCT CACCA TGACG-3'

4.2.7.2 试剂盒探针:

Taqman 探针:5'-ATCCA TCGTG GCGGT CATAT CCAC-3'

探针 5'端由 FAM 标记,3'端由 TAMRA 标记。

4.2.7.3 DNA 提取试剂(已配成成品)。

4.2.7.4 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-盐酸(pH 8.4),200 mmol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化镁。

4.3 仪器和设备

4.3.1 全自动荧光定量 PCR 仪。

4.3.2 普通 PCR 仪。

4.3.3 微量荧光检测仪:上海棱光 DA620(或同类型产品)。

4.3.4 离心机:最大转速 13 000 r/min 以上。

4.3.5 恒温培养箱:30 °C~60 °C。

4.3.6 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。

4.3.7 低温冰箱:-20 °C~4 °C。

4.3.8 均质器。

4.3.9 制冰机。

4.3.10 恒温水浴箱:30 °C~60 °C。

4.3.11 灭菌样品处理器具:取样勺、剪刀、镊子。

4.3.12 样品稀释瓶:250 mL、500 mL。

4.3.13 可调移液器:5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL。

5 操作步骤

5.1 样品的收集和处理

5.1.1 取样

样品按 GB/T 4789.1 方法收样,无菌操作均匀取样。如为冷冻样品,应于 2 °C~5 °C 解冻,且不超过 18 h;若不能及时检验,应置于-15 °C 保存。非冷冻的易腐样品应尽可能及时检验,若不能及时检验,应置于 4 °C 冰箱保存,在 24 h 内检验。

无菌操作称取 50 g 检样放于均质杯内,以灭菌剪刀充分剪碎。

5.1.2 增菌检测样品处理

新鲜样品:上述均质杯内加入 30 g/L 氯化钠稀释液 450 mL,均质混匀;取 1 mL 样品稀释液接种到 10 mL 单料氯化钠多粘菌素 B 肉汤,37 °C 18 h~24 h 进行选择增菌培养。

经加热、辐射处理或冷藏、冻结的样品:在均质杯内加入 60 g/L 氯化钠蛋白胨液 450 mL,均质混匀;于 37 °C 18 h~24 h 增菌培养。

5.1.3 无需增菌直接检测样品处理

在均质杯内加入 30 g/L 氯化钠稀释液 450 mL,混合均匀后,直接进行模板 DNA 的提取。

5.2 模板 DNA 的提取

从样品增菌液的表层(或样品稀释液管中)取 1 mL 培养液加入到 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,尽量弃去上清液,加入 1 mL 灭菌的双蒸水清洗 1 次后离心,同样尽量弃去上清液。加入 50 μL DNA 提取液充分混匀,室温放置 10 min 后,进行沸水浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新管备用(提取的 DNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70 °C 冰箱)。

5.3 荧光定量 PCR 检验

5.3.1 检验准备

从试剂盒中取出 PCR 反应管,加入提取好的 DNA 模板 5 μL。每次检验分别设置含有扩增片段的质粒为阳性对照,灭菌双蒸水为阴性对照,以及临界阳性对照。

5.3.2 全自动荧光定量 PCR 仪测试

全自动荧光定量 PCR 仪扩增反应参数设置：

——第一阶段,预变性 93 °C,2 min;

——第二阶段,93 °C 45 s,55 °C 60 s,10 个循环;

——第三阶段,93 °C 30 s,55 °C 45 s,30 个循环,荧光收集设置在第三阶段每次循环的退火延伸时进行。

荧光通道选择 FAM。

5.3.3 普通 PCR 仪合并微量荧光检测器测试

第一步:PCR 仪扩增反应条件设为预变性 93 °C 2 min;93 °C 30 s 变性;55 °C 1 min 退火及延伸,10 个循环;暂停,33 °C 保温,迅速逐个将反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_0 (初始荧光值)。

第二步:PCR 仪扩增反应条件设为预变性 93 °C 2 min;93 °C 30 s 变性;55 °C 1 min 退火及延伸,30 个循环;暂停,33 °C 保温,同样迅速逐个将扩增后的反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_1 (终止荧光值)。

荧光检测器设定:荧光激发波长为 487 nm,检测波长为 525 nm。

6 结果及判断

6.1 全自动荧光定量 PCR 仪结果判断

6.1.1 阈值设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪音情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

6.1.2 质控标准

阴性质控品:扩增曲线不呈 S 型曲线或者 C_t 值 = 30.0。

阳性质控品:扩增曲线呈 S 型曲线,强阳性质控品定量参考值在 1.774×10^4 基因拷贝/mL ~ 1.409×10^5 基因拷贝/mL 范围;临界阳性质控品定量参考值在 1.774×10^2 基因拷贝/mL ~ 1.409×10^3 基因拷贝/mL 范围。

以上要求需在同一实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

6.1.3 结果描述及判定

6.1.3.1 阴性

扩增曲线不呈 S 型曲线或 C_t 值等于 30,表示样品中无副溶血性弧菌,或者样品中副溶血性弧菌低于检测低限。

6.1.3.2 阳性

扩增曲线呈 S 型曲线且 C_t 值小于等于 27,表示样品中存在副溶血性弧菌。

6.1.3.3 实验灰度区

若 $27 < C_t \text{ 值} < 30$,实验需要重新进行。若重做结果的 C_t 值小于 30,且扩增曲线呈 S 型曲线,则判为阳性;否则增菌后复检。

6.2 普通 PCR 仪和荧光检测器结果判断

计算每个样品荧光检测器两步结果的差: $A_x = A_1 - A_0$ 。将阴性质控品管的 A_x 称为 N ,临界阳性标准品的 A_x 值称为 P_1 ,强阳性标准品的 A_x 称为 P_2 。如:阴性质控品为阴性;阳性标准品为阳性;同时 $P_2 > P_1 > N$ 时,本次实验有效;否则,实验无效,应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

实验有效的前提下,样品 $A_x > N + 0.6 \times (P_1 - N)$ 判为阳性;如果 $N + 0.6 \times (P_1 - N) \geq A_x \geq N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 则属于实验灰度区,需重复实验一次,若重复实验结果 A_x 值 $\geq N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 判为阳性,否则判为阴性;如果 A_x 值 $< N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 判为阴性。

6.3 确证

检验筛选出阳性的样本,按 GB/T 4789.7 和 SN/T 0173 进行确证。

6.4 计数

副溶性弧菌的计数按 SN/T 0173 进行。

6.5 方法灵敏度

经 24 h 培养增菌,样品的检测限为 10 CFU/g;若不经增菌,样品的检测限是 10^4 CFU/g。

6.6 检验程序

见附录 B。

7 防止污染和废弃物处理的措施

7.1 检验过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 的规定执行。

7.2 检验过程中的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 30 g/L 氯化钠稀释液

氯化钠 30.0 g
蒸馏水 1 000 mL

加热溶解,调至 pH 7.0,121 °C 高压灭菌 15 min,以无菌操作分装于 500 mL 广口瓶或 500 mL 三角瓶,每瓶 450 mL。

A.2 60 g/L 氯化钠蛋白胨水(PW)

蛋白胨 10.0 g
氯化钠 60.0 g
蒸馏水 1 000 mL

将各成分加热溶解,调至 pH 7.2,无菌操作分装于 500 mL 广口瓶或 500 mL 三角瓶,每瓶 450 mL。

A.3 氯化钠多粘菌素 B 肉汤(SPB)

酵母浸膏 3.0 g
蛋白胨 10.0 g
氯化钠 20.0 g
多粘菌素 B 250 单位/mL 培养基
蒸馏水 1 000 mL

将各成分(除多粘菌素 B 外)加热溶解,校正 pH 7.4,于 121 °C 高压灭菌 15 min,待冷至 45 °C ~ 50 °C 时加入多粘菌素 B(配成水溶液)混匀,分装于灭菌的 17 mm×170 mm 试管,每管 10 mL。

A.4 试剂盒组成

试剂盒组成见表 A.1。

表 A.1 试剂盒组成

组 分 名 称	规 格	数 量
DNA 提取液	500 μL/管	2
PCR 反应管(或用于 LightCycler 的反应盖)	1 人份/管	20
临界阳性质控品	150 μL/管	1
强阳性质控品	150 μL 管	1
阳性定量参考品(1.0×10 ⁴ 基因拷贝/mL)	10 μL/管	1
阳性定量参考品(1.0×10 ⁵ 基因拷贝/mL)	10 μL/管	1
阳性定量参考品(1.0×10 ⁶ 基因拷贝/mL)	10 μL/管	1
阳性定量参考品(1.0×10 ⁷ 基因拷贝/mL)	10 μL/管	1
阴性质控品	150 μL/管	1

说明:

DNA 提取液的主要成分为异硫氰酸胍和氢氧化钠,于 4 ℃ 保存。

PCR 反应管中含有特异性引物、探针及各种离子。

使用时的注意事项:

由于阳性样品中模板浓度相对较高,检测过程中不得交叉污染。

反应液分装时应尽量避免产生气泡,上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

除 DNA 提取液外,其他试剂-20 ℃ 保存。有效期为 6 个月。

附录 B
(规范性附录)
荧光 PCR 检验方法程序

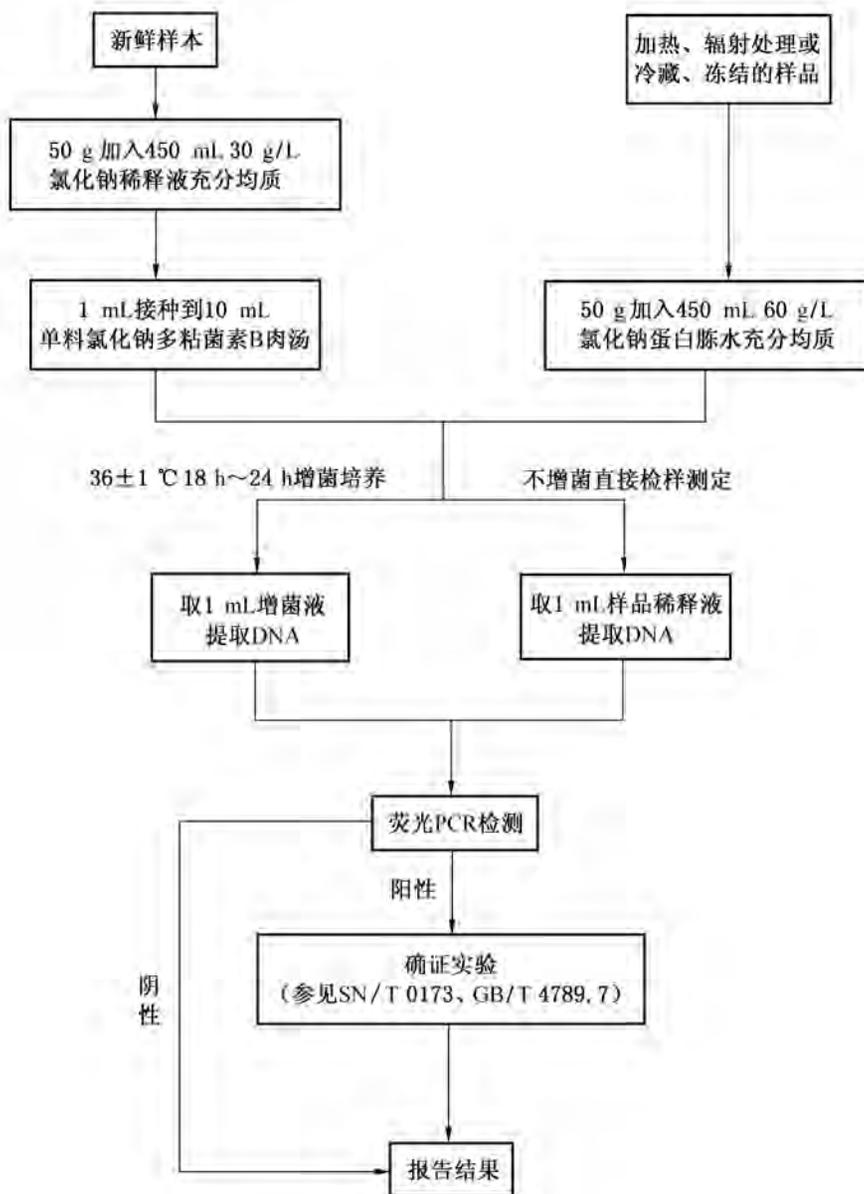


图 B.1 荧光 PCR 检验方法程序